

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14877 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/53**

WITTE, Torsten [DE/DE]; Ibykusweg 16b, 30629 Hannover (DE). BERG, Wigbert [DE/DE]; Astheimer Weg 23, 55130 Mainz (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/08051**

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. August 2000 (17.08.2000)

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, 81679 München (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 39 575.6 20. August 1999 (20.08.1999) **DE**

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ORGENTEC DIAGNOSTIKA GMBH** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 49, 55129 Mainz (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MATTHIAS, Torsten** [DE/DE]; Schwebnitzer Strasse 19, 55237 Flonheim (DE).

WO 01/14877 A2

(54) Title: **METHOD OF DIAGNOSING SJÖGREN'S SYNDROME**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON SJÖGREN-SYNDROM**

(57) Abstract: The invention relates to a method of diagnosing Sjögren's syndrome and to a suitable kit of reagents.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom und einen dafür geeigneten Reagenzienkit.

Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom und einen dafür geeigneten Reagenzienkit.

10

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronische Systemerkrankung, charakterisiert durch Trockenheit der Augen (Keratoconjunctivitis sicca), des Mundes (Xerostomia sicca) und anderer Schleimhäute. Wenn das Sjögren-Syndrom nur die Augen und den Mund erfaßt, spricht man von einem primären Sjögren-Syndrom. Beim sekundären Sjögren-Syndrom treten zusätzlich als Komplikation verschiedene Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, z.B. rheumatoide Arthritis, Sklerodermie und Lupus erythematoses auf. Die Prävalenz der Erkrankung schwankt zwischen ca. 0,1 bis 0,5 % der Bevölkerung.

15

Die Diagnostik des Sjögren-Syndroms erfolgt nach bestimmten Klassifikationskriterien, die

20

- (1) okuläre Symptome,
- (2) orale Symptome,
- (3) okuläre Befunde, d.h. positive Schirmer- oder Rose-Bergal-Test,
- (4) histologische Befunde,
- 25 (5) Befunde an der Speicheldrüse, beispielsweise aufgrund von Speicheldrüsenbiopsie und
- (6) Nachweis von Autoantikörpern, z.B. Anti-Ro/SSA oder Anti-La/SSB, antinukleäre Antikörper oder Rheumafaktoren, umfassen.

25

30

In den USA müssen alle der genannten sechs Kriterien für eine Diagnose des Sjögren-Syndroms erfüllt sein, während in Europa nur vier dieser sechs Kriterien genügen.

- 2 -

Da Autoantikörper eine große Rolle beim Sjögren-Syndrom spielen, ist man seit Jahren bemüht einen spezifischen Marker für diese Erkrankung zu finden. Die unter Punkt 6 oben aufgeführten Autoantikörper sind jedoch unspezifisch und kommen auch bei vielen anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises vor.

Autoantikörper gegen α -Fodrin wurden in Patienten mit Sjögren-Syndrom nachgewiesen (Haneji et al. Science 276 (1997), 604-607; Miyagawa et al., J. Invest. Dermatol. 111 (1998) 1189-1192 und Watanabe et al., Dermatol. 135 (1999), 535-539). α -Fodrin-Autoantikörper der Immunglobulinklasse G wurden in Patienten mit Sjögren-Syndrom, aber auch in Patienten mit Lupus erythematodes mittels Immunblot gefunden. Diese Befunde weisen daraufhin, daß IgG-Antikörper gegen α -Fodrin keine spezifische Assoziation mit dem Vorhandensein der Sjögren-Syndroms haben. Außerdem wurden die Daten an einer relativ geringen Anzahl an Patienten erhoben. In einer Publikation wurde ein Patientenkollektiv aus 43 Patienten mit primärem und 8 Patienten mit sekundärem Sjögren-Syndrom getestet. In allen nachfolgenden Publikationen wurden 9 Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom und 15 Patienten mit sekundärem Sjögren-Syndrom getestet.

Bei eigenen Untersuchungen der Erfinder an größeren Patientenkollektiven (94 Patienten mit Sjögren-Syndrom, 352 Patienten mit systemischem Lupus erythematodes und 160 Kontrollpersonen) konnte die hohe Spezifität von IgG-Autoantikörpern gegen α -Fodrin für das Sjögren-Syndrom nicht bestätigt werden. Statt dessen konnte gezeigt werden, daß IgA-Autoantikörper gegen α -Fodrin eine wesentlich höhere Spezifität aufweisen, nämlich 99,7% für das primäre Sjögren-Syndrom.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom, wobei man in einer Probe, die üblicherweise aus einem zu untersuchenden Patienten stammt, das Vorhandensein oder/und die Menge von IgA-Autoantikörper gegen α -Fodrin bestimmt.

- 3 -

Das Auftreten signifikanter Mengen von IgA-Autoantikörpern gegen α -Fodrin ist hochspezifisch für das Vorhandensein von Sjögren-Syndrom, insbesondere von primärem Sjögren-Syndrom, d.h. eine falsch positive Diagnose kann weitgehend ausgeschlossen werden. Das Verfahren hat im
5 übrigen auch eine hohe Sensitivität von etwa 70%, die noch verbessert werden kann, wenn - zusätzlich zur IgA-Bestimmung - das Vorhandensein oder/und die Menge von Autoantikörpern anderer Immunglobulinklassen, z.B. IgG oder/und IgM, gegen α -Fodrin bestimmt wird. So kann beispielsweise durch eine zusätzliche Bestimmung von IgG-Autoantikörpern
10 die Sensitivität des Verfahrens noch um 10% erhöht werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als qualitative oder quantitative Bestimmung durchgeführt werden. Bei einer qualitativen Bestimmung werden IgA-Autoantikörper-Konzentrationen, die oberhalb einem
15 sogenannten Cut-Off-Wert liegen, als positiv klassifiziert. Die Bestimmung des Cut-Off-Werts kann durch Kalibrierung des Testsystems mit positiven und negativen Kontrollproben erfolgen. Alternativ kann auch eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden.

20 Die zu testende Probe ist im allgemeinen eine humane Körperflüssigkeit, von der bekannt ist, daß sie IgA-Antikörper und ggf. andere Antikörper enthalten kann. Beispiele für geeignete Körperflüssigkeiten sind Blut, Serum, Plasma oder Speichel, wobei Serum besonders bevorzugt ist.

25 Die Bestimmung der IgA-Antikörper gegen α -Fodrin kann nach beliebigen auf dem Sachgebiet bekannten Testformaten erfolgen. Vorzugsweise verwendet man ein α -Fodrin-Antigen und einen IgA-spezifischen Rezeptor. Das α -Fodrin-Antigen kann ein natives Protein, welches aus humanen Zelllinien erhältlich ist, oder ein rekombinantes Antigen sein, welches in einer
30 heterologen Wirtszelle, z.B. einer Bakterienzelle wie E.coli oder einer eukaryontischen Wirtszelle wie einer Insektenzelle durch rekombinante Proteinexpression hergestellt wurde. Vorzugsweise verwendet man ein

- 4 -

rekombinantes α -Fodrin Antigen, welches die Sequenz des nativen α -Fodrins oder Teile davon, insbesondere den N-terminalen Abschnitt enthält. Das rekombinante Antigen kann darüber hinaus heterologe Peptid- oder Polypeptiddomänen enthalten, z.B. eine poly-His-Sequenz, welche die
5 Aufreinigung nach der Expression erleichtert.

Der IgA-spezifische Rezeptor ist im allgemeinen ein Antikörper, der in der Lage ist, Immunglobuline der Klasse A in Gegenwart von Immunglobulinen anderer Klassen, z.B. G oder/und M, selektiv zu erkennen. Für diesen Zweck
10 können polyklonale Anti-IgA-Antiseren verwendet werden, die durch Immunisierung von Versuchstieren, z.B. Ziegen, Ratten, Mäusen, Kaninchen etc. mit humanen IgA nach bekannten Methoden erhältlich sind. Ebenso können jedoch entsprechende monoklonale Anti-IgA-Antikörper eingesetzt werden.

Wie bereits ausgeführt, ist das spezifische Testformat im allgemeinen unkritisch. Vorzugsweise wird jedoch ein heterogenes Testformat verwendet, besonders bevorzugt ein heterogenes Testformat, bei dem ein Immunkomplex bestehend aus α -Fodrin-Antigen, nachzuweisendem IgA-
20 Autoantikörper und IgA-spezifischem Rezeptor an eine Festphase gebunden wird (Sandwich-Testformat). Ebenso kann jedoch auch ein kompetitives Testformat gewählt werden.

Bei einem heterogenen Sandwich-Testformat kann man

- 25 (a) ein auf der Festphase immobilisiertes α -Fodrin-Antigen und einen markierten IgA-spezifischen Rezeptor oder
 (b) einen auf der Festphase immobilisierten IgA-spezifischen Rezeptor und ein markiertes α -Fodrin-Antigen verwenden.

30 Als Festphasen können Reaktionsgefäße, Mikrotiterplatten, Beads, Biochips etc. eingesetzt werden. Die Immobilisierung des Antigens bzw. des Rezeptors auf der Festphase kann durch adsorptive Wechselwirkungen,

- 5 -

kovalente Bindung oder vermittelt über ein hochaffines Bindepaar (Streptavidin/Biotin, Hapten/Anti-Hapten-Antikörper) erfolgen. Das immobilisierte Testreagenz kann in einer bereits festphasengebundenen Form eingesetzt oder aber auch erst im Verlauf des Tests immobilisiert werden.

Das Verfahren kann als Flüssigtest (z.B. in einem Reaktionsgefäß) oder auch als Trockentest (z.B. auf einem Teststreifen) durchgeführt werden.

Das markierte Testreagenz kann selbst eine nachweisbare bzw. signalgebenden Gruppe tragen (direkte Markierung) oder mit einer nachweisbaren Gruppe bindefähig sein (indirekte Markierung). Die Markierungsgruppe kann beliebig aus allen aus dem Stand der Technik für immunologische Nachweisverfahren bekannten Markierungsgruppen ausgewählt werden, beispielsweise aus Enzymen, Metall- oder Latexpartikeln, sowie lumineszierenden oder fluoreszierenden Gruppen. Besonders bevorzugt wird die Markierungsgruppe aus Enzymen, z.B. Peroxidase, β -Galactosidase oder Alkalische Phosphatase ausgewählt und das Verfahren im ELISA-Format durchgeführt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testkit zur Diagnose von Sjögren-Syndrom umfassend

- (a) ein α -Fodrin-Antigen und
- (b) einen IgA-spezifischen Rezeptor.

Weiterhin kann der Testkit (c) eine Festphase umfassen, an die eines der Testreagenzien (a) oder (b) gebunden ist oder bindefähig ist. Darüber hinaus umfaßt der Testkit vorzugsweise (d) eine Markierungsgruppe, die an eines der Testreagenzien (a) oder (b) gebunden ist oder damit bindefähig ist.

Außerdem kann der Testkit (e) mindestens ein weiteres Antikörperklassenspezifisches Testreagenz enthalten, falls neben IgA-Autoantikörpern auch

- 6 -

noch α -Fodrin-Autoantikörper anderer Immunglobulinklassen bestimmt werden sollen. Beispiele für solche Antikörperklassen-spezifische Testreagenzien sind Anti-IgG-Antikörper oder Protein G zur selektiven Bindung von IgG-Autoantikörpern bzw. Anti-IgM-Antikörper zur selektiven Bindung von IgM-Autoantikörpern. Der Testkit kann darüber hinaus noch weitere übliche Reagenzien wie Puffer, Substrate und Waschlösungen enthalten.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele verdeutlicht werden:

Beispiele

1. Material und Methoden

1.1 Seren

Seren von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom wurden in Austin, Texas (n = 49), Freiburg, Deutschland (n = 20) und Hannover, Deutschland (n = 18) gesammelt. Die Diagnose von Sjögren-Syndrom war in Austin nach den US-amerikanischen San Diego Kriterien und in Deutschland nach den modifizierten europäischen Kriterien für die Klassifizierung von Sjögren-Syndrom erfolgt.

Seren von Patienten mit Systemischen Lupus erythematodes (SLE) mit oder ohne sekundärem Sjögren-Syndrom wurden in Hannover gewonnen. Die Diagnose von sekundärem Sjögren-Syndrom erfolgte unter Verwendung der modifizierten europäischen Klassifikationskriterien.

Zusätzlich wurden Aliquots von 352 tiefgefrorenen Serumproben verwendet, die zuvor für eine deutsche SLE-Untersuchung gesammelt worden waren. Alle 352 Patienten erfüllten mindestens vier der ACR-

Kriterien für die Diagnose von SLE (Tan et al., Arthr. and Rheum. 25 (1982), 1271-1277). Überlappende Syndrome wurden ausgeschlossen. In vorhergehenden Untersuchungen waren die Patienten ausführlich hinsichtlich ihrer Klinik- und Laborparameter charakterisiert worden. Da
5 einige dieser Parameter nicht bei allen 352 Patienten bestimmt worden waren, erfolgten die Korrelationen mit den verfügbaren Daten, wobei für jeden Klinikparameter Daten von mindestens 339 Patienten und für jeden Laborparameter Daten von mindestens 1 Patienten verwendet wurden.

10 160 Seren von Blutspendern wurden als Kontrolle für die Spezifität des Nachweisverfahrens untersucht.

1.2 Nachweis von Antikörpern gegen α -Fodrin durch einen ELISA

15 Die cDNA für den N-terminalen Abschnitt von α -Fodrin wurde aus der von einer humanen Speicheldrüse isolierten mRNA durch PCR kloniert. Die Primer hatten die Position 93-130 (upstream) und 1827-1882 (downstream), wobei ein Konstrukt mit 1731 bp erhalten wurde (Nummerierung entsprechend Moon et al., J. Biol. Chem. 265 (1991) 4427-
20 4433). Die cDNA wurde in prokaryontische und eukaryontische Expressionsvektoren (pet32b (Novagen) bzw. pVL1393 (Pharmingen)) kloniert und in Form eines His-Tag-Fusionsproteins in E.coli und Sf9 Insektenzellen exprimiert. Das rekombinante Protein wurde zur Beschichtung von ELISA-Platten verwendet.

25 Die Seren wurden 1:100 in einem Verdünnungspuffer pH 7,4 (75 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) verdünnt. 100 μ l der verdünnten Seren wurden 30 min auf den ELISA-Platten inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit Verdünnungspuffer unter Verwendung eines automatisierten ELISA Waschgeräts (SLT
30 Labinstruments, Grödig, Österreich) wurde mit Meerrettichperoxidase markiertes Ziegenantiserum, das für IgG oder IgA spezifisch war, für 15 min zugegeben. Nach drei weiteren Waschschritten mit Verdünnungspuffer

- 8 -

wurden 100 μ l Tetramethylbenzidin als Substrat für einen Zeitraum von 15 min zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 1 M HCl gestoppt und die Extinktion (OD) bei 450 nm unter Verwendung eines ELISA Auswertungsgeräts (Rainbow Reader SLT-Labinstruments, Grödig, Österreich) bestimmt.

Um einen Standard für den ELISA zu bestimmen, wurden zehn Seren von Patienten mit primären Sjögren-Syndrom vermessen. Die Konzentration von α -Fodrin-Antikörpern in dem Serum mit der höchsten OD wurde willkürlich mit 100 U/ml definiert. Dieses Serum wurde als Laborstandard verwendet.

Zum täglichen Kalibrierung wurde dieses Referenzserum in Konzentrationen entsprechend 0, 12, 5, 25, 50 und 100 U/ml verwendet. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurden die gemessenen OD-Werte in einer logarithmisch/linearen Skala aufgetragen.

1.3 Nachweis von Rheumafaktoren sowie der Autoantigene Ro und La

IgG-, IgA- und IgM-Rheumatoidfaktoren sowie Autoantikörper gegen Antigene Ro und La wurden unter Verwendung kommerziell erhältlicher ELISA Systeme gemäß den Vorschriften des Herstellers (ORGenTec GmbH, Mainz, Deutschland) bestimmt.

1.4 Statistische Auswertung

Das Vorhandensein von IgG- und IgA-Antikörpern gegen α -Fodrin in den 352 von SLE Patienten erhaltenen Seren wurde mit Klinik- und Laborparametern in Korrelation gebracht.

Für die statistische Auswertung wurden nicht-parametrische Tests verwendet, da die Verteilung von Rheumafaktoren eindeutig von einer Gausschen Verteilung abwich. Die Korrelation von Antikörpern gegen α -

Fodrin mit Klinik- und Laborparametern wurde unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests bestimmt. Eine Assoziierungswahrscheinlichkeit von weniger als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2. Ergebnisse

2.1 Verteilung von IgA und IgG Antikörpern gegen α -Fodrin in Patienten - und Kontrollproben

In 160 Seren von Blutdonoren war der Mittelwert (\pm Standardabweichung) der Konzentration von IgA- bzw. IgG-Antikörpern gegen α -Fodrin 9,2 U/ml \pm 5,5 U/ml bzw. 11,1 U/ml \pm 7,2 U/ml. Der Prozentsatz von Seren mit Antikörpern gegen α -Fodrin wurde unter Verwendung eines Cut-Off-Werts berechnet, der als mittlere Konzentration von Antikörpern gegen α -Fodrin in den Seren von Blutdonoren plus 3 Standardabweichungen definiert wurde (entsprechend 25 U/ml für IgA-Antikörper und 32 U/ml für IgG-Antikörper).

Mittels dem in 1.2 beschriebenen ELISA-Test wurden IgA-Antikörper gegen α -Fodrin in 53 der 83 Seren von Patienten von primärem Sjögren-Syndrom identifiziert (64%). In 7 von 15 Seren aus Patienten mit SLE und Sjögren-Syndrom wurden ebenfalls IgA-Antikörper gegen α -Fodrin gefunden (47%).

IgA-Antikörper gegen α -Fodrin waren nur in einem von 160 Blutdonor-Seren und in einem von 50 Seren von SLE Patienten ohne Sjögren-Syndrom nachweisbar. Daraus ergab sich eine Testspezifität von 99,7%.

IgG-Antikörper gegen α -Fodrin wurden in 48 von 83 Seren aus Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom nachgewiesen (57%). In 6 von 15 Seren aus Patienten mit SLE und sekundärem Sjögren-Syndrom konnten ebenfalls IgG-Antikörper gegen α -Fodrin gefunden werden (40%).

- 10 -

IgG-Antikörper gegen α -Fodrin wurden auch in 3 von 160 Blutdonor-Seren und in keinem von 50 Seren aus SLE Patienten ohne Sjögren-Syndrom nachgewiesen.

- 5 10% der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom hatten nur IgG-Antikörper, aber keine IgA-Antikörper gegen α -Fodrin.

Es konnte keine Korrelation des Vorhandenseins von IgG- und IgG-Anti- α -Fodrin-Antikörpern mit Autoantikörpern gegen Ro, La, und IgA- bzw. IgG-Rheumafaktoren in den 83 Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom
10 gefunden werden.

2.2 Assoziation von IgA- und IgG-Antikörpern gegen α -Fodrin mit SLE-Klinikparametern

15

Das Vorhandensein von IgA-Antikörpern gegen α -Fodrin zeigte eine positive Korrelation mit den Parametern Erythem ($p < 0,01$) und Fötalverlust ($p < 0,05$). Das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen α -Fodrin korrelierte mit kutaner Vasculitis ($p < 0,05$) und Arthralgie ($p < 0,05$).

20

2.3 Assoziation von IgG- und IgA-Antikörpern gegen α -Fodrin mit SLE-Laborparametern

Das Vorhandensein von IgA-Antikörpern gegen α -Fodrin zeigte eine positive
25 Korrelation mit den Parametern erhöhte IgA-Konzentration ($p < 0,001$), erhöhte IgM Konzentration ($p < 0,05$), Neutropenie ($p < 0,05$), IgG-Antikörper gegen Cardiolipin ($p < 0,01$), IgA ($p < 0,001$) und IgM ($p < 0,05$) Autoantikörper gegen $\beta 2$ Glykoprotein und IgG Rheumafaktoren ($p < 0,05$). IgG Antikörper gegen α -Fodrin korrelierten nur schwach mit einer positiven
30 Critidie-Reaktion ($p < 0,05$).

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in einer aus einem Patienten stammenden Probe das
Vorhandensein oder/und die Menge von IgA-Autoantikörpern gegen
 α -Fodrin bestimmt.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Probe eine humane Körperflüssigkeit, insbesondere Blut,
Serum, Plasma oder Speichel, verwendet.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Bestimmung der IgA-Autoantikörper ein α -Fodrin-Antigen
und einen IgA-spezifischen Rezeptor verwendet.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein heterogenes Testformat verwendet.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Sandwich-Testformat verwendet.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) ein immobilisiertes α -Fodrin-Antigen und einen markierten IgA-
spezifischen Rezeptor oder

- 12 -

(b) einen immobilisierten IgA-spezifischen Rezeptor und ein markiertes α -Fodrin-Antigen verwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 6,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Markierungsgruppe ausgewählt wird aus Enzymen, Metall- oder Latexpartikeln sowie lumineszierende oder fluoreszierende Gruppen.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet,

daß man weiterhin das Vorhandensein oder/und die Menge von Autoantikörpern anderer Immunglobulinklassen gegen α -Fodrin bestimmt.

9. Verfahren nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß man weiterhin IgG- oder/und IgM-Autoantikörper gegen α -Fodrin bestimmt.

10. Testkit zur Diagnose von Sjögren-Syndrom umfassend

(a) ein α -Fodrin-Antigen und

(b) einen IgA-spezifischen Rezeptor.

11. Testkit nach Anspruch 10, weiterhin umfassend

(a) eine Festphase, an die eine der Testreagenzien (a) oder (b) gebunden oder bindefähig ist.

12. Testkit nach Anspruch 10 oder 11, weiterhin umfassend

(d) eine Markierungsgruppe, die an eines der Testreagenzien (a) oder (b) gebunden oder damit bindefähig ist.

- 13 -

13. Testkit nach einem der Ansprüche 10 bis 12 weiterhin umfassend
 - (e) mindestens ein weiteres Antikörperklassen-spezifisches Testreagenz.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. März 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/14877 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/564,
33/68

[DE/DE]; Schwebnitzer Strasse 19, 55237 Flonheim (DE).
WITTE, Torsten [DE/DE]; Ibykusweg 16b, 30629 Han-
nover (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08051

(74) Anwälte: **WEICKMANN, H.** usw.; Kopernikusstrasse 9,
81679 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. August 2000 (17.08.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 39 575.6 20. August 1999 (20.08.1999) DE

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **ORGENTEC DIAGNOSTIKA GMBH** [DE/DE];
Carl-Zeiss-Strasse 49, 55129 Mainz (DE). **BERG, Wig-**
bert [DE/DE]; Astheimer Weg 23, 55130 Mainz (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 7. September 2001

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MATTHIAS, Torsten**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/14877 A3

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING SJÖGREN'S SYNDROME

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON SJÖGREN-SYNDROM

(57) Abstract: The invention relates to a method of diagnosing Sjogren's syndrome and to a suitable kit of reagents suitable for said method. The inventive method is characterized by determining the presence and/or the quantity of IgA alpha-fodrin autoantibodies in a specimen obtained from a patient.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von Sjögren-Syndrom und einen dafür geeigneten Reagenzienkit dadurch gekennzeichnet, dass man in einer aus einem Patienten stammenden Probe das Vorhandensein oder/und die Menge von IgA-Autoantikörpern gegen alpha-Fodrin bestimmt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/564 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | <p>QUAN C P ET AL: "Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans." INFECTION AND IMMUNITY, (1997 OCT) 65 (10) 3997-4004. XP000982212 abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p> | 10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2001

Date of mailing of the international search report

16/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intr ional Application No
PCT/EP 00/08051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | ISHIMARU NAOZUMI ET AL: "Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjogren's syndrome through Fas-mediated apoptosis." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 155, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 173-181, XP000986725 ISSN: 0002-9440 abstract page 175, left-hand column, paragraph 2 --- | 1-13 |
| A | MIYAGAWA SACHIKO ET AL: "Neonatal lupus erythematosus: Maternal IgG antibodies bind to a recombinant NH2-terminal fusion protein encoded by human alpha-fodrin cDNA." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 111, no. 6, December 1998 (1998-12), pages 1189-1192, XP000986884 ISSN: 0022-202X cited in the application the whole document --- | 1-13 |
| A | WATANABE TAKAHIRO ET AL: "Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren syndrome and lupus erythematosus." ARCHIVES OF DERMATOLOGY, vol. 135, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 535-539, XP000986733 ISSN: 0003-987X cited in the application the whole document --- | 1-13 |
| T | WITTE TORSTEN ET AL: "IgA and IgG autoantibodies against alpha-fodrin as markers for Sjogren's syndrome." JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 27, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 2617-2620, XP000986732 ISSN: 0315-162X the whole document ----- | 1-13 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08051

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/564 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | <p>QUAN C P ET AL: "Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans." INFECTION AND IMMUNITY, (1997 OCT) 65 (10) 3997-4004. XP000982212 Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p> | 10 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08051

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | <p>ISHIMARU NAOZUMI ET AL: "Estrogen deficiency accelerates autoimmune exocrinopathy in murine Sjogren's syndrome through Fas-mediated apoptosis." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 155, Nr. 1, Juli 1999 (1999-07), Seiten 173-181, XP000986725 ISSN: 0002-9440 Zusammenfassung Seite 175, linke Spalte, Absatz 2</p> | 1-13 |
| A | <p>MIYAGAWA SACHIKO ET AL: "Neonatal lupus erythematosus: Maternal IgG antibodies bind to a recombinant NH2-terminal fusion protein encoded by human alpha-fodrin cDNA." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, Bd. 111, Nr. 6, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1189-1192, XP000986884 ISSN: 0022-202X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> | 1-13 |
| A | <p>WATANABE TAKAHIRO ET AL: "Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjogren syndrome and lupus erythematosus." ARCHIVES OF DERMATOLOGY, Bd. 135, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 535-539, XP000986733 ISSN: 0003-987X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> | 1-13 |
| T | <p>WITTE TORSTEN ET AL: "IgA and IgG autoantibodies against alpha-fodrin as markers for Sjogren's syndrome." JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, Bd. 27, Nr. 11, November 2000 (2000-11), Seiten 2617-2620, XP000986732 ISSN: 0315-162X das ganze Dokument</p> | 1-13 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)